

Sukkulamadot sisäilmaongelmien biosensoreina

(Työsuojelurahaston rahoittama hanke 115155)

Loppuraportti

TURUN YLIOPISTO

Biologian laitos ja Aerobiologian yksikkö

Päivi Koskinen ja Annika Saarto

2018



Turun yliopisto
University of Turku



Työsuojelurahasto
Arbetarskyddsfonden
The Finnish Work Environment Fund

ISBN 978-951-29-7164-0 (nid.)

ISBN 978-951-29-7165-7 (PDF)

Grano Oy – Turku, Suomi, 2018

Sisällys

JOHDANTO.....	4
Sisäilman huono laatu on merkittävä terveydellinen ja kansantaloudellinen ongelma.....	4
Biomonitoroinnin avulla tunnistetaan pienetkin pitoisuudet.....	4
Sukkulamatojen aistinvaraista käyttäytymistä on mahdollista hyödyntää sisäilmatutkimuksissa.....	5
TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	5
TUTKIMUSAINEISTO JA MENETELMÄT	6
Aineisto	6
Altistukset	6
Analysointimenetelmät	6
TULOKSET	6
Kemotaksiakokeet.....	7
Homeuutteet	7
Nestepisarat.....	7
Homeiden haihtuvat yhdisteet.....	7
Johtopäätökset ja hankkeen tulevaisuuden suunnitelmat.....	8
TUTKIMUSRYHMÄ JA YHTEISTYÖKUMPPANIT.....	8
Tutkimusryhmä	8
Tutkimusyhteistyö	9
JULKAISUTOIMINTA	9
VIITTEET.....	10

JOHDANTO

Sisäilman huono laatu on merkittävä terveydellinen ja kansantaloudellinen ongelma

Sekä julkisten että asuinrakennusten sisäilmaongelmat ovat enenevässä määrin esillä julkisuudessa. Työperäisiä hengitystieallergioita todetaan Suomessa joka vuosi sadoittain, ja homesienien osuus niiden epäiltynä aiheuttajana on suuri. Ammattitautien lisäksi home- ja sisäilmaongelmat aiheuttavat vuosittain suuren määrän sairauspoissaoloja. Sisäilmaa ei poissaolon syynä ole tapana kirjata tilastoihin, eikä sisäilmaongelmien osuutta sairauspoissaoloihin voida siksi tarkkaan arvioida. Sisäilmaongelmat kuitenkin ilmenevät lisääntyneinä hengitystieoireina sekä infektioina. Lisäksi ne usein aiheuttavat oireilijoille ja koko työyhteisölle stressiä. Korjaustoimenpiteiden jälkeenkin on usein havaittavissa skeptisyyttä ja jopa psykosomaalista oireilua korjattuun rakennukseen palaavissa työntekijöissä. Olisikin tärkeää kyetä luotettavasti osoittamaan rakennuksessa aiemmin oireilleille, että korjauksilla on pystytty poistamaan oireilun syy.

Sekä ennen että jälkeen korjausten on sisäilmaongelmien lähteitä usein hankala tunnistaa tai paikallistaa. Siksi tarvitaan aiempaa tehokkaampia ja luotettavampia menetelmiä haitallisten ympäristötekijöiden ja niiden aiheuttamien toksisten vasteiden biomonitorointia varten. Jos ja kun sisäilman haitallisia vaikutuksia voidaan biomonitoroinnin avulla arvioida jo etukäteen, pystytään korjaavat toimenpiteet kohdistamaan oikein ja siten vähentämään vakavia altistuksia.

Biomonitoroinnin avulla tunnistetaan pienetkin pitoisuudet

Biomonitoroinnissa signaalien havaitsemiseen käytetään biomolekyyliä, elävää eliötä tai elion osia joko sellaisenaan (bio-indikaattorit) tai jonkin mittalaitteen osana (biosensorit). Biomonitoroinnin ideana on tunnistaa toksiset ja muut oireita aiheuttavat yhdisteet samoilla tai pienemmillä pitoisuuksilla kuin mihin ihmisen aistit pystyvät, ja siten varoittaa ajoissa vaaratekijöistä.

Kosteusvauriutilanteissa muodostuvien toksisten aineiden biomonitorointiin kehitettiin kotimaisessa Toxtest-projektissa (2010-2012, www.stm.fi) erilaisia bakteeri- tai eukaryoottisolujen kasvuun sekä sian siittiöiden liikkuvuuteen perustuvia analysointimenetelmiä. Mitään näistä menetelmistä ei kuitenkaan voitu projektin päätyttyä sellaisenaan suositella. Ongelmat saattoivat tosin olla enemmän näytteiden otossa kuin niiden analysoinnissa, sillä näytteiksi kerätyn laskeutuneen pölyn sisältämä toksisuus ei tutkimustulosten mukaan korreloinut sen enempää rakennusten kosteusvaurioiden kuin siellä työskentelevien henkilöiden oireiden suhteen. Siksi onkin tärkeää löytää sekä toimivia näytteenottotapoja että nopeita ja herkkiä bio-indikaattoreita, joilla mikrobien ja muiden sisäilman epäpuhtauksien terveydelle haitallisia vaikutuksia voidaan monitoroida.

Sukkulamatojen aistinvaraista käyttäytymistä on mahdollista hyödyntää sisäilmatutkimuksissa

Sukkulamatojen soveltuvuudesta biomonitorointiin on saatu todisteita jo 1990-luvulla (Candido ja Jones, 1996), mutta vasta viime vuosina kehitetyt fluoresoivat reportterikannat ovat mahdollistaneet ympäristöperäisten näytteiden, kuten raskasmetallien vaikutusten laajamittaisemman analysoinnin (Anbalagan ym. 2012). Sisäilmaongelmien monitorointiin niitä ei kuitenkaan ole aiemmin käytetty, vaikka ne kokonaisina organismeina voisivat siihen soveltua soluviljelmiä paremmin. Sukkulamadot aistivat karkottavina aineina monia ihmistenkin ikäviksi haistamia yhdisteitä (Bargmann ym. 1993), ja voivat siten tarjota uudenlaisen innovaation mikrobien sisäilmaan tuottamien haihtuvien orgaanisten aineiden (mVOC = microbial volatile organic compounds; Korpi ym. 2009) havainnointiin.

Sukkulamadoista yleisin laboratoriossa käytetty laji on *Caenorhabditis elegans*, joka on noin millimetrin mittainen maaperäeliö. Se viihtyy monenlaisessa maaperässä, kunhan kosteutta ja lämpöä on riittävästi, ja käyttää maaperän mikrobeja ravinnokseen. Tämä ihmiselle harmiton laji on osoittautunut käteväksi geneettisen ja fysiologisen tutkimuksen malliorganismiksi, joka pystyy monipuolisesti aistimaan ympäristöään. Sillä on hyvin kehittynyt kemosensoirinen hermosto, jonka solujen pinnalla olevat sadat erilaiset kemoreseptorit tunnistavat haihtuvia hajuja tai vesiliukoisia makuja (Bargmann 2006). Näin sukkulamato pystyy löytämään ravintonsa, välttämään sille vaarallisia pieneliöitä ja jopa vaipumaan horrokseen, jos olosuhteet eivät ole suotuisat. Haju- ja makureseptorien toimintaa sekä niiden välittämien aistimusten integraatiota voidaan tutkia mm. kemotaksiakokein, joissa mitataan sukkulamatojen liikkeitä erilaisia haihtuvia tai kasvualustaan imeytyviä aineita kohti (houkuttelevat aineet) tai niistä poispäin (karkottavat aineet). Lisäksi sukkulamatoja voidaan kasvattaa rinnakkain terveyshaitallisten mikrobien kanssa ja seurata mikrobien erittämien hajuaineiden ja toksiinien vaikutuksia sukkulamatojen käyttäytymiseen, lisääntymiseen ja kuolleisuuteen (Popova ym. 2012).

TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tämä Työsuojelurahaston rahoittama tutkimusprojekti koostuu kahdesta osasta, tässä raportoitavasta pilottihankkeesta (6/2015 – 6/2016) sekä sitä välittömästi seuranneesta jatkohankkeesta (7/2016 – 1/2018). Pilottihankkeen tavoitteena oli testata eri menetelmiä, joilla voitaisiin määrittää fluoresoivia reporttereita ilmentävien sukkulamatojen herkkyyttä sisäilman tai rakennusmateriaalinäytteiden sisältämille terveydelle haitallisille ympäristötekijöille, kuten kosteusvaurioita indikoiville mikrobeille ja niiden tuottamille toksiineille. Jatkohankkeen tavoitteena oli optimoida näitä menetelmiä lisää ja kehittää niiden pohjalta biomonitorointiin soveltuvia toksisuustestejä sekä laboratorio- että kenttäkäyttöön.

TUTKIMUSAINEISTO JA MENETELMÄT

Aineisto

Tutkimuksissamme olemme käyttäneet transgeenisia sukkulamatoja, joita olemme saaneet yhteistyökumppaneiltamme sekä Caenorhabditis Genetics Center-instituutista, jonne tutkijat eri puolilta maailmaa voivat tallentaa sukkulamatojaan ja josta muut tutkijat niitä voivat tilata. Meidän käyttämämme kannat ilmentävät eri stressitekijöille herkkien säätelyalueiden ohjaamina vihreää fluoresoivaa proteiinia (GFP = green fluorescent protein). Näiden kantojen avulla voidaan mitata haitallisten ympäristötekijöiden aiheuttamia proteiinien konformaation muutoksia sekä muita stressireaktioita, sillä tällaiset muutokset aktivoivat lämpöshokkiproteiinien (HSP = heat shock protein) perheeseen kuuluvien geenien ilmenemistä solujen eri osissa. Osa käyttämistämme yhdeksästä eri reportterikannoista reagoi miltei mihin tahansa stressinaiheuttajaan, mutta osa oli spesifisempiä.

Altistukset

Sukkulamadot synkronoitiin kokeita varten, jotta saatiin nuoria aikuisia sisältäviä populaatioita. Sitten sukkulamatoja altistettiin puhtaille mikrobien tuottamille haihtuville aineille, sisäilmaongelmista kärsivistä rakennuksista kerätyistä homeista eristetyille uutteille tai rihmastojen erittämille nestepisaroille. Altistukseen käytettiin myös kosteusvauriorakennuksista eristettyjen mikrobien puhdasviljelmiä tai kontrolliksi niiden kasvatusalustoja.

Analysointimenetelmät

Erilaisille aineille altistettuja sukkulamatoja tarkasteltiin joko suoraan niiden kasvatusalustoilla tai siirtämällä ne mustille 96-kuoppalevyille, joiden pohjat olivat optisesti läpäiseviä. Sukkulamadoista valmistettiin myös mikroskooppinäytteitä objektilaseille. Sukkulamatoja tarkasteltiin valomikroskoopilla (Olympus CK40 tai Leitz Fluovert FS) tai fluoresenssimikroskoopilla (Zeiss Axiovert M200). Fluoresenssin intensiteetti mitattiin mikroskooppiin liitetyllä digitaalikameralla otetuista kuvista ImageJ-kuvantamisohjelmalla. 96-kuoppalevyjen fluoresenssin absorbanssi mitattiin myös spektrofotometrisesti Envision-kuoppalevylukijalla. Tulokset analysoitiin tilastollisen analyysin ohjelmilla.

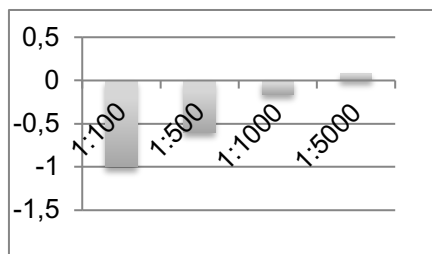
TULOKSET

Tämän pilottihankkeen aikana pyrimme optimoimaan eri menetelmiä, joista mitään ei sellaisenaan oltu aiemmin käytetty laboratoriossamme. Saimme varmistettua, että eri menetelmät teknisesti toimivat. Onnistuimme myös osoittamaan, että mikroskopia- ja spektrometriamenetelmät tukevat toisiaan eli että näillä menetelmillä saadaan luotettavasti samansuuntaisia tuloksia.

Kemotaksiakokeet

Kemotaksiakokeita varten sukkulamatoja sijoitettiin agarmaljan keskelle ilman ravintobakteereita. Maljan toiselle puolelle laitettiin pisara liuotinainetta (esim. etanoli) ja toiselle puolelle houkuttelevaa tai karkottavaa hajuainetta liuottimeen laimennettuna. Puolen tunnin inkubaation jälkeen sukkulamatojen määrät laskettiin eri puoliskoilta. Näiden määrien pohjalta määritettiin kemotaktinen indeksi, joka on positiivinen (max +1) houkutteleville aineille ja negatiivinen (max -1) karkottaville aineille.

Monet haitalliset mikrobit tuottavat oktenolia, joka kemotaksiakokeissa osoittautui selvästi sukkulamatoja karkottavaksi aineeksi jo pienilläkin pitoisuuksilla (**Kuva 1**). Kemotaksiakokeissa testattiin myös homeuutteita ja nestepisaroita, jotka olivat sukkulamadoille enemmän tai vähemmän karkottavia.



Kuva 1. Kemotaksiakokeiden alustavia tuloksia.

Sukkulamatojen annettiin valita, lähtevätkö ne kohti etanoliin laimennettua oktenolia vai kontrollina käytettyä pelkkää etanolia. Y-akselin kemotaktinen indeksi oli sitä negatiivisempi, mitä karkottavamaksi X-akselilla ilmoitettu hajuaineen laimennos koettiin.

Homeuutteet

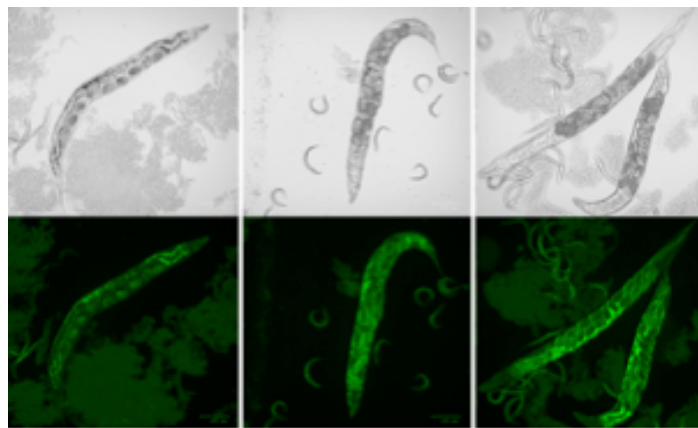
Uutimme homekasvustoja veteen ja etanoliin, jolloin saimme talteen sekä vesi- että rasvaliukoisia toksineja. Sukkulamatoja kasvatettiin sitten vuorokauden ajan kuoppalevyillä eri toksiinipitoisuuksia sisältäneissä nestekasvatuksissa. Homeuutteiden käyttö ja kemotaksiakokeet osoittivat sen, että eri mikrobien vaikutukset voivat välittyä sukkulamatoihin eri tavoilla eli joko haju- tai makuaistin kautta.

Nestepisararat

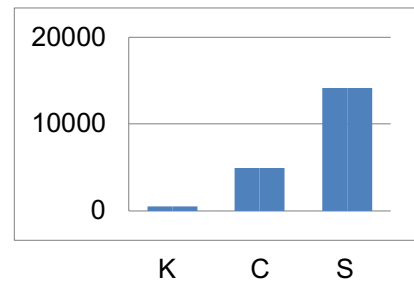
Nestekasvatuskokeissa käytimme myös homekasvustoista kerättyjä nestepisaroita, joiden toksiinipitoisuudet oli määritetty Helsingin yliopistossa. Joidenkin nestepisaroiden toksiinipitoisuudet olivat hyvinkin korkeita ja aiheuttivat sukkulamadoissa selvän vasteen huomattavasti laimennettuinakin.

Homeiden haihtuvat yhdisteet

Käytimme kaksiosaisia petrimaljoja, joiden toisella puolella kasvatimme tutkittavia homeita tai aktinomykeettejä ja toisella puolella sukkulamatoja. Tällaisilla kokeilla tutkimme ilman kautta välittyvien aineiden vaikutuksia ja saimme määritettyä fluoresenssieroja sekä mikroskoopilla että spektrofotometrillä (**Kuva 2**).



K = kontrolli C = Chaetomium homesieni S = S. californicus aktinomykeetti



Spektrometrinen absorbanssin analyysi

Kuva 2. Alustavia tuloksia sukkulamatojen ja mikrobien rinnakkaiskasvatuksista

Johtopäätökset ja hankkeen tulevaisuuden suunnitelmat

Pilottihankkeen aikana saadut tulokset vaikuttavat lupaavilta, sillä altistus mikrobeille tai niiden tuottamille toksineille näyttää aiheuttavan sukkulamadoille selkeän fluoresoivan vasteen, jota voidaan kvantitatiivisesti mitata sekä mikroskooppisesti, spektrometrisesti että kemotaksian keinoin. Hankkeen työryhmään saatiin koottua tarvittavaa asiantuntemusta sekä sukkulamatojen että sisäilmaongelmien osalta, joten ne yhdistämällä on jatkohankkeessa mahdollista tuottaa uutta arvokasta tietoa sisäilmaongelmien arvioinnin ja ennaltaehkäisyyn tehostamiseksi. Pitkän tähtäyksen tavoitteenamme on kehittää fluoresoivien reportterimatojen avulla toksisuustesti tai testipatteristo. Tämä edellyttää testeiltä riittävää herkkyyttä ja tarkkuutta sekä sitä, että näytteitä on helppoa ja kohtuuhintaista ottaa, säilyttää ja analysoida. Uskomme sukkulamatomatopohjaisten testien täyttävän nämä edellytykset ja jopa vähentävän työvaiheita, jos erillisiä mikrobi- ja materiaalinäytteitä ei edes ole enää tarpeen ottaa, vaan sukkulamatomat voidaan altistaa suoraan testattavan paikan mikrobistolle ja niiden tuottamille aineille. Parhaimmillaan ne tarjoavat non-invasiivisen menetelmän, jolla voidaan rakenteita rikkomatta saada selville, onko työpaikan sisäilma terveydelle haitallista, mutta niitä voidaan myös käyttää rakennusmateriaalinäytteiden terveyshaittojen monitorointiin. Pilottihankkeen aikana saimme pystytettyä keskeiset menetelmät, joita optimoimalla nämä jatkohankkeelle asetetut tavoitteet on mahdollista saavuttaa.

TUTKIMUSRYHMÄ JA YHTEISTYÖKUMPPANIT

Tutkimusryhmä

Dos. Päivi Koskinen, yliopistonlehtori, Biologian laitos, Turun yliopisto
Projektin suunnittelu, johto, ohjaus ja raportointi, 1 kk, 6/2015 – 6/2016

FT Sari Paavanen-Huhtala, tutkija, Biologian laitos, Turun yliopisto
Projektin käytännön toteutus, 9,5 kk, 9/2015 – 6/2016

LuK Elina Bergman, opiskelija, Biologian laitos, Turun yliopisto
Kesätyöntekijä, 3 kk, 6-8/2015

LuK Jonna Pörsti, opiskelija, Biokemian laitos, Turun yliopisto
Kesätyöntekijä, 3 kk, 6-8/2015

FilYo Joni Eklund, opiskelija, Biologian laitos, Turun yliopisto
Kesätyöntekijä, 6/2016

Tutkimusyhteistyö

FT Annika Saarto, Aerobiologian yksikön johtaja, yliopistontutkija, Turun yliopisto
Projektin suunnittelu, ohjaus ja raportointi, 1 vk, 6/2015 – 6/2016

FM Anna-Mari Pessi, erikoistutkija, Aerobiologian yksikkö, Turun yliopisto
Projektin suunnittelu, homesienien tunnistus, 1 vk, 6/2015 – 6/2016

FM Sirkku Häkkinen, mykologi, rakennusterveysasiantuntija, Aerobiologian yksikkö, Turun yliopisto
Projektin suunnittelu, homesienien tunnistus

FT Maria Andersson, tutkija, rakennustekniikan laitos, Aalto-yliopisto
Homeista eristettyjä uutteita ja nestepisaroita projektin käyttöön, toksiinien määrittäminen

Emeritaprofessori Mirja Salkinoja-Salonen, mikrobiologi, Helsingin yliopisto
Asiantuntemusta sisäilmaongelmista ja niiden määrittämenetelmistä

Dos. Carina Holmberg-Still, tutkimusjohtaja, Biomedicum Helsinki
Sukkulamatoasiantuntemusta sekä sukkulamatojen käyttöön

Professori David de Pomerai, Nottinghamin yliopisto
Sukkulamatoasiantuntemusta sekä sukkulamatojen käyttöön

JULKAISUTOIMINTA

Hankkeessa kehitettävistä menetelmistä jätettiin Turun yliopistolle keksintöilmoitus 5.9.2016. Koska niillä voi olla kaupallista arvoa, edellytti aineiston oikeudet omistava Turun yliopisto, että menetelmien yksityiskohtaisempaa julkistamista siirretään, kunnes keksinnöllisyys ja teollisoikeudellisen suojauksen tarve on saatu selvitettyä. Menetelmien pääperiaatteet ja kaksivaiheisen hankkeen alustavat tulokset julkaistiin Sisäilmastoseminaarissa 2017 (Paavanen-Huhtala ym. 2017).

VIITTEET

Anbalagan C, Lafayette I, Antoniu-Kourounioti M, Haque M, King J, Baillie J, Gurierrez C, Rodriguez Martin JA & De Pomerai D. Transgenic nematodes as biosensors for metal stress in soil pore water samples. *Ecotoxicology* 21, 439, 2012.

Bargmann CI, Hartweg E & Horvitz HR. Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell* 74, 515, 1993.

Bargmann CI. Chemosensation in *C. elegans*. Wormbook 2006 (www.wormbook.org)

Candido EPM & Jones D. Transgenic *Caenorhabditis elegans* strains as biosensors. *TIBTECH* 14, 125, 1996.

Korpi A, Järnberg J & Pasanen AL. Microbial volatile organic compounds. *Crit Rev Toxicol* 39, 139-193, 2009.

Paavanen-Huhtala S, Kalichamy K, Häkkinen S, Pessi AM, Saarto A & Koskinen P. Sukkulamadot sisäilmaongelmien bioindikaattoreina. Sisäilmastoseminaari, SIY raportti 35, 251-255, 2017.

Popova AA, Koksharova OA, Lipasova VA, Zaitseva JV, Katkova-Zhukotskaya OA, Eremina S, Mironov A, Chernin LS & Khmel IA. Inhibitory and toxic effects of volatiles emitted by strains of *Pseudomonas* and *Serratia* on growth and survival of selected micro-organisms, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *BioMed Res Int* 125704, 2014.